

염분스트레스에 의한 소나무잎 Peroxidase의 활성 및 Isozyme Pattern의 변화

이 미 영

순천향대학교 생명과학부

The Changes of Peroxidase Activity and Isoperoxidase Patterns from Pine Needles under the Salinary Stress

Lee, Mi Young

Department of Life Science, Soonchunhyang University

ABSTRACT

Peroxidase activities and isozyme patterns of the pine needles (*Pinus densiflora*) were examined and compared in the coastal regions of Anmyun-Do(Choongnam, Taean-Gun) and inland regions of Shinchang-Myun(Choongnam, Asan-City). The pine needle peroxidase from Anmyun-Do showed approximately three times higher specific activity than Shinchang pine needle peroxidase. The pine needle extracts of Anmyun-Do and Shinchang contained three anionic isoperoxidases, named A1, A2 and A3, when subjected to starch gel electrophoresis at pH 7.0. Cationic isoperoxidases could not be found in both extracts. However, there existed unique isoperoxidase An only from the extracts of Anmyun-Do pine needles under the salinary environment. Moreover, the specific activities of catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from Anmyun-Do, known for the inducible enzymes under the stress condition, were about 1.8 times higher than those of Shinchang pine needles. However, the specific activities of other enzymes did not show great differences between the two regions. Considering the above results of the higher specific activity of peroxidase and the unique expression of isoperoxidase An, pine needle peroxidase might involve in the defence mechanism against the salinary stress of Anmyun-Do.

Key words: Pine needle (*Pinus densiflora*), Peroxidase, Salinary stress.

서 론

식물체들은 지속적으로 주변환경으로부터 스트레스를 받고 있으며, 이러한 스트레스에 대하여 여러 가지 반응을 나타내면서 적응하기도 하고, 스트레스로 인한 노화의 촉진으로 실질적인 손상을 입기도 한다(Lee and Oh 1994). 환경스트레스에 대한 식물의 반응기작으로는 회피, 배제, 개선, 그리고 내성 등이 있는데 최근 식물체의 내성을 스트레스하에서 특징적으로 생성되는 물질에 의해 설명하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 예

를 들면, 내염성 식물인 *Triglochin maritima*는 고염분조건에서 다량의 proline를 축적하였으며 다른 아미노산의 함량 증가에 비해 proline 함량 증가가 매우 높다는 것을 보여 주므로써 식물의 내염성에 proline이 관여한다는 사실을 보여주었다(Brett and Waldron 1990). 또한 환경스트레스에 의해 활성이 크게 증가되는 몇 종류의 효소가 알려져 이들이 식물의 스트레스에 대한 방어기작에 관여할 것으로 추측되고 있는데 그 대표적인 효소가 바로 peroxidase이다(Wongkaew *et al.* 1991).

다양한 형태로 고등식물에 널리 존재하는 peroxidase는 세포의 분화와 성장을 조절하는 기능을 가지고 있으며 indole-3-

acetic acid의 산화, 환원형 pyrimidine nucleotide의 산화, pyridoxal과 관련된 화합물의 산화, methional의 ethylene으로의 전환, phenolic compound의 산화, lignification과 세포벽의 합성, 병원체에 대한 방어 등 여러 가지 다양한 촉매 반응을 나타낸다(Grisebach 1981). Peroxidase isozyme의 효소학적 특성 규명과 더불어 세포내 분포를 알고자 하는 연구가 활발히 진행되었는데, 그 중 세포벽 peroxidase들의 활성은 세포가 노화됨에 따라 증가하며 이들 peroxidase들이 lignin을 합성하여 제 2차 세포벽 형성에 관여하고, suberin을 합성하여 상처에 대한 보호작용도 한다고 보고되었다(Fry 1986). Peroxidase의 활성에 영향을 주는 요소로는 온도, 빛의 유무, 손상 등의 주위환경과 저온(고온) 및 저(고)염분 등의 각종 스트레스, 그리고 auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene 같은 호르몬 등을 들 수 있다(van Huystee and Cairns 1982). 이 중에서 각종 환경스트레스에 따른 peroxidase isozyme pattern변화는 isoperoxidase의 생리적 기능을 유추할 수 있게 할 뿐만 아니라, 식물체의 스트레스 지표로 사용될 수 있다(Ederva *et al.* 1993). 특히 대기 오염 등의 환경오염에 의한 특정효소의 활성변화 및 발현에 대한 연구는 최근야야 비로소 주목을 끌게 되어서, 1993년 소나무의 extracellular peroxidase가 O_3 에 의해 생산되는 유독성 산화물에 대한 방어 기작으로 이해되고 있고(Alonson *et al.* 1993), 전나무나 보리의 apoplastic peroxidase가 대기오염의 주범 중의 하나인 SO_2 를 산화시켜서 무독화시키는 반응에 관여할 가능성이 제시되었다(Kammerer *et al.* 1993). 고염분 스트레스를 받게 되는 바닷물이 미치는 해안지역과 축적되는 염을 씻어내지 못하는 건조 내륙지역에서 자라는 식물들은 고농도의 염에 의한 삼투압을 극복하고, Na^+ , Cl^- 등이 나타내는 독성을 극복할 수 있는 방어체계가 존재할 것이나 이에 대한 본격적인 연구가 진행되지 않고 있는 실정이다. 본 연구에서는 충남 태안군 안면도 해안가와 충남 아산시 신창면 내륙지역을 설정하여 두 지역에서 자라는 소나무(*Pinus densiflora*)의 peroxidase의 효소활성과 isozyme pattern을 비교 분석하고 다른 효소와의 상관관계를 조사함으로써 특정 peroxidase isozyme의 활성과 isozyme pattern 변화를 고염분스트레스와 연결시켜서 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험식물

충남 태안군 안면도 해안지역과 충남 아산시 신창지역 소나무 생태의 가장 큰 환경적 차이는 염의 농도이므로, 1995년 7월과 8월에 소나무숲으로 유명한 안면도해안지역과 순천항대가 위치한 아산시 신창지역에서 소나무(*Pinus densiflora*)를 각각

10개 구역에서 무작위로 채취하여 실험재료로 사용하였다.

소나무잎에서 peroxidase 추출

채취한 소나무잎에 45 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 소나무잎 무게(g)당 0.5(ml)의 비율로 넣고 sea sand와 함께 막자사발에서 균질화시켰다. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 상등액을 취해 30%~90% 황산암모늄을 처리하였다. 황산암모늄으로 분별침전된 효소용액을 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)으로 투석시킨 후 동일 완충용액으로 평형화되어 있는 CM-cellulose column에 주입하였다. 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 의해 용출되는 단백질 중 peroxidase활성이 있는 부분만을 모아서 효소원으로 사용하였다(Fig. 1).

Peroxidase의 활성측정 및 단백질 정량

Peroxidase의 활성은 guaiacol과 hydrogen peroxide를 기질로 하여 470nm에서 흡광도의 증가를 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 측정하였다(Kim *et al.* 1980). 효소반응액은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 15 mM guaiacol, 5 mM H_2O_2 와 효소 용액을 포함하여 최종부피가 1 ml가 되도록 하였다. 효소반응은 H_2O_2 를 마지막으로 가한 후 측정하였다. 효소 활성도 1 unit은 470 nm에서 1분간 흡광도 1이 증가하는 효소의 양으로 정하였으며, 비활성도는 단백질량에 대한 효소활성 (unit)으로 결정하였다.

효소액의 단백질은 Lowry 방법을 변형하여 측정하였다(Lowry *et al.* 1951).

Starch gel electrophoresis와 활성염색

Starch gel electrophoresis는 5 mM의 histidine buffer (pH 7.0) 60 ml에 electrostarch를 7g 넣고 끓여서 gel tray에서 굳힌 후 0.41 M sodium citrate buffer (pH 7.0)을 음극과 양극의 tank buffer로 사용하여, 120 V 에서 약 3시간 동안 수행하였다. 전개가 끝난 gel의 활성염색은 gel을 dimethylformamide에 녹인 3-amino-9-ethylcarbazole과 hydrogen peroxide로 구성된 활성염색용액에 담가 붉은색의 band가 나타날 때까지 염색하였다.

6-Phosphogluconate dehydrogenase의 활성측정

95 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM

6-phosphogluconate와 효소원을 넣은 후 1 mM NADP⁺을 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 한 후 반응을 시작하였다. 6-Phosphogluconate dehydrogenase의 효소활성은 340 nm에서의 흡광도 변화를 통하여 측정하였다(Schomburg and Stephan 1991a).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성 측정

50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose-6-phosphate와 효소원을 넣은 후 1 mM NADP⁺을 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 한 후 반응을 시작하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소활성은 340 nm에서의 흡광도 변화를 통하여 측정하였다(Schomburg and Stephan 1991b).

Succinate dehydrogenase의 활성 측정

50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP와 효소원을 넣고 20 mM Na-succinate를 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 한 후 반응을 시작하였다. Succinate dehydrogenase의 활성은 DICPIP감소에 따른 흡광도 변화를 620 nm에서 측정하였다(Hiatt 1961).

Catalase의 활성 측정

60 mM phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM H₂O₂와 효소원을 넣은 후 전체 부피가 1 ml가 되게 반응을 시작하였다. Catalase의 활성은 240 nm에서의 흡광도 감소를 통하여 측정하였다(Aebi 1974).

Isocitrate lyase의 활성 측정

85 mM phosphate buffer (pH 7.0), 4 mM DTT, 4.5 mM MgCl₂, 10 mM phenylhydrazine chloride, 0.01% Triton X-100, 효소원을 넣은 후 4 mM threo-D₃-isocitrate를 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 하여 반응을 시작하였다. Isocitrate lyase의 활성은 glyoxylate phenylhydrazine 생성에 따른 흡광도 변화를 324 nm에서 측정하였다(Schomburg and Stephan 1991c).

Malate synthase의 활성 측정

0.1 M Tris-HCl butter (pH 8.0), 0.5 mM MgCl₂, 1.0 mM

DTNB, 1.0 mM acetyl CoA, 효소원을 넣은 후, 3.3 mM sodium glyoxylate를 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 하여 반응을 시작하였다. Malate synthase의 활성은 412 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다(Schomburg and Stephan 1991d).

Glycolate oxidase의 활성 측정

50 mM phosphate buffer (pH 8.0), 3.0 mM EDTA, 10 mM phenylhydrazine chloride와 효소원을 넣은 후 50 mM sodium glycolate를 가하여 전체 부피가 1 ml가 되게 하여 반응을 시작하였다. Glycolate oxidase의 활성은 324 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다(Feierabend and Beevers 1972).

결과 및 고찰

효소원의 추출

안면도 10개 지역과 신창 10개 지역에서 채취한 재래종 소나무 잎으로부터 황산암모늄 분별침전법과 CM-cellulose chromatography를 통하여 peroxidase를 추출했다(Fig. 1).

안면도 소나무와 신창 소나무 peroxidase의 비활성도 비교

각각 10개 지역에서 채취한 안면도 소나무와 신창 소나무로부터 추출한 peroxidase의 비활성도를 평균값±표준편차로 나타내어 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 안면도 소나무 peroxidase의 비활성도는 약 1.3이고 신창 소나무 peroxidase의 비활성도는 약 0.42이므로 안면도 소나무 peroxidase의 비활성도가 신창 소나무 peroxidase의 비활성도보다 평균 3 배 높았다. 이러한 peroxidase의 비활성증가 현상은 안면도 지역의 환경스트레스에 대한 소나무의 방어체계에 peroxidase가 관여했을 가능성을 제시한다. 고염분에 의해 식물에 일어나는 대사반응으로서는 식물체의 성장저해, 탄소대사의 변화, osmolyte의 축적, NaCl분포 변화와 에너지 대사의 교란 등이 있다(Valpuesta *et al.* 1993). 고염분스트레스를 받는 식물체는 염으로부터 자신을 보호하기 위해서 ligno-suberization을 활발하게 일으키게 된다고 알려져 있으며(Gaspar *et al.* 1991), 옥수수, 사탕수수 등은 고염분환경으로 수분을 빼앗기지 않으려는 방어기작으로 lignin을 합성하게 된다고 보고되어 있다(Azaizah and Steudle 1991). 식물세포벽에 존재하는 peroxidase에 의하여 세포벽을 구성하는 페놀화합물의 교차반응을 통해서 lignin합성이 촉진되므로(McDogall 1993, Sanchez *et al.* 1993, Padu *et al.* 1993) 염분스트레스에 노출되어 있는 안면도 지역 소나무의 peroxi-

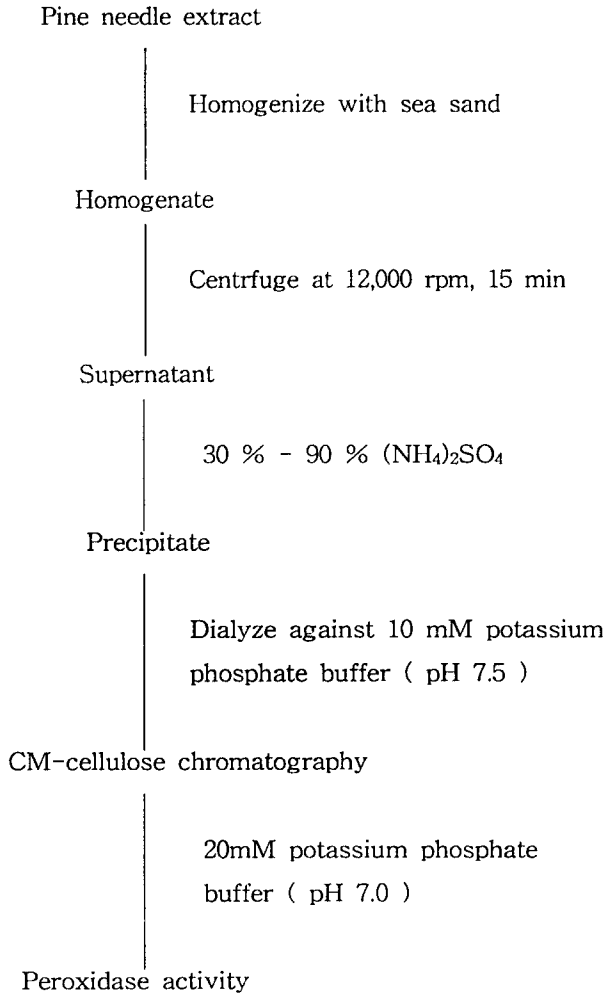


Fig. 1. Flow diagram for the fractionation of peroxidase activity from pine needle (*Pinus densiflora*) of Anmyun-Do and Shinchang.

dase활성증가 현상을 lignification에 의한 방어기작으로 설명할 수 있다.

안면도 소나무와 신창 소나무 peroxidase의 isozyme pattern 비교

안면도 소나무와 신창 소나무로부터 추출한 peroxidase의 isozyme pattern을 starch gel상에서 비교하였다(Fig. 3). Iso-peroxidase명명은 Kim의 명명법(Kim *et al.* 1980)에 따라 표기하였다. 즉 C와 A는 각각 cationic 및 anionic isoperoxidase를 지칭하며 이들 영문자 아래의 숫자는 cathode와 anode로 이동하는 전기이동의 순서를 나타낸다. 내륙지역인 신창의 소나무잎에서는 cathode로 이동하는 cationic isopero-

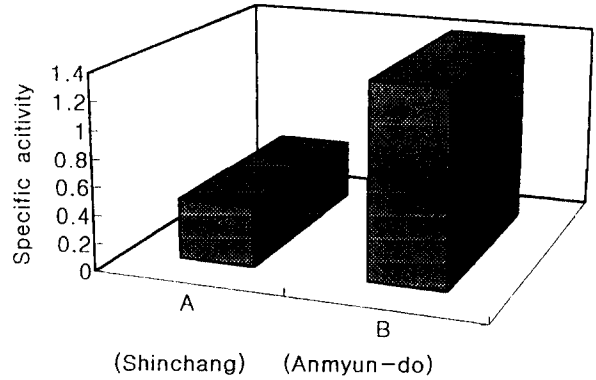


Fig. 2. Specific activities of pine needle (*Pinus densiflora*) peroxidases from Shinchang (A) and Anmyun-Do (B).

oxidase는 나타나지 않았고, 3개의 anionic isozyme A1, A2, A3가 비슷한 활성강도로 존재하였다 (Fig. 3). 이에 비하여 고염분 스트레스를 받게 되는 안면도 소나무잎에는 A1과 A2의 사이에 특이하게 과량 존재하는 peroxidase isozyme이 존재하였고 이를 isoperoxidase An이라고 명명하였다. 안면도 소나무 peroxidase에서도 신창 소나무 peroxidase와 마찬가지로 cationic isoperoxidase는 존재하지 않았고, A1, An, A2, A3 등의 anionic isoperoxidase만이 존재하였다(Fig. 3). 일반적으로 동일 종의 식물에서는 동일한 효소 pattern을 관찰하게 되므로 안면도 소나무 잎에만 특이하게 존재하는 peroxidase isozyme An은 안면도 해안지역의 고염분환경에 대한 방어기

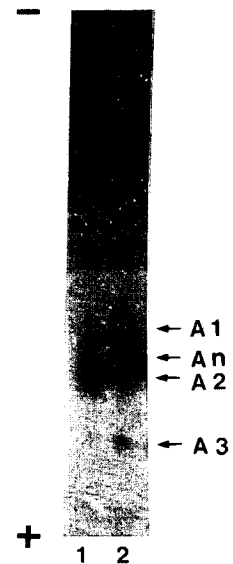


Fig. 3. Starch gel electrophoregram of pine needle (*Pinus densiflora*) peroxidases from Shinchang (1) and Anmyun-Do (2).

작으로서 과량 유도되었을 것으로 추측된다.

고등식물의 peroxidase는 물리화학적 성질 및 효소학적 특성이 서로다른 여러 개의 isozyme을 가지고 있는데 peroxidase isozyme pattern은 세포의 성장과 노화, 호르몬, 감염이나 상처에 의한 손상, 온도 그리고 빛의 유무에 따라서도 변화한다고 보고되어 왔다(van Huystee and Cairns 1982). 또한 peroxidase의 효소학적 다양성과 더불어 단백질 수준에서 효소의 발현에 미치는 여러 가지 조건들을 연구 종합하여 peroxidase가 식물의 성장과 분화에 관련된 효소라고 많은 학자들에 의해 주장되어 왔으며, 특히 최근 환경문제의 중요성과 더불어 각종 스트레스에 따른 peroxidase isozyme의 pattern 변화에 관한 연구가 진행되기 시작하였다. 전나무와 보리에 있어서는 공기 오염원인 sulfur dioxide의 독성을 제거하는데 apoplastic peroxidase가 관여할 가능성이 제시되었고(Pfanz *et al.* 1993) 대기 오염이 심한 곳에서 자라는 가로수일수록 세포질이나 subcellular organelle에 존재하는 peroxidase보다 세포벽에 존재하는 peroxidase의 활성이 매우 높게 나타날 뿐만 아니라 특정 peroxidase isozyme의 pattern에 변화를 보였다 (Wongkaew *et al.* 1991). 1993년 대기오염에 의해 증가되는 소나무의 extracellular peroxidase 활성은 O₃에 의해 생산되는 유독성 산화물에 대한 방어 기작으로 보고되었고(Alonson *et al.*, 1993), 전나무나 보리의 apoplastic peroxidase가 대기오염의 주범 중의 하나인 SO₂를 산화시켜서 무독화시키는 반응에 관여할 가능성이 있다고 제시되기는 했으나 (Kammerer *et al.* 1993), 아직 본격적인 연구가 진행되지 않고 있는 실정이다. 게다가 고염분 스트레스를 받은 토마토의 경우 peroxidase mRNA의 조직특이성 발현양상을 통하여 고염분조건에서 토마토 뿌리에서 유도되는 TPX1 mRNA가 ligno-suberization에 관여할 것으로 추측되었다(Valpuesta *et al.* 1993). 고염분스트레스를 받은 무뿌리에서는 anionic isoperoxidase가 급격하게 증가했고 무 seedling에서는 염분농도가 증가할수록 far-migrating cathodic isoperoxidase가 증가하며 비활성도도 증가하였다. 이러한 보고 내용을 종합하여 볼 때 고염분환경으로 수분을 빼앗기지 않으려는 방어기작으로 isoperoxidase An이 유도되어 페놀화합물의 교차반응을 통해서 lignin합성을 촉매할 것으로 추측된다.

각종 효소활성비교

안면도의 소나무의 peroxidase의 비활성도 증가와 isoperoxidase An의 발현유도가 안면도의 지역적인 특성으로 인한 환경스트레스에 의한 것인지를 간접적으로 알아보려고 peroxidase이외의 다양한 효소를 선택하여 비활성도를 조사하였다 (Table 1). 그 결과 신창지역 소나무 추출액에 비하여 안면도지

Table 1. Comparisons of specific activities of various enzymes from pine needle between Anmyun-Do and Shinchang. The activity values are expressed as mean±standard deviation of the ten samples of pine needles.

Enzyme	Regions	
	Anmyun-Do	Shinchang
6-Phosphogluconate dehydrogenase	0.85±0.26	0.79±0.3
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.2 ±0.27	0.66±0.15
Succinate dehydrogenase	0.98±0.26	1.1 ±0.23
Catalase	0.98±0.28	0.54±0.1
Isocitrate lyase	2.3 ±0.54	2.2 ±0.2
Malate synthase	0.72±0.28	0.8 ±0.2
Glycolate oxidase	0.23±0.04	0.21±0.08

역 소나무 추출액의 catalase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 비활성도가 약 1.8 배 높게 나타났다. 그러나 다른 효소들의 비활성도는 평균적으로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. Peroxidase와 함께 catalase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase등의 효소가 병원균 감염, 발달단계 및 외부 stress에 의해 증가했다는 보고내용을 고려해 볼 때(Lim and Kim 1986), 안면도 소나무 peroxidase의 비활성도 증가와 anionic isoperoxidase An의 발현을 안면도지역의 고염분 환경스트레스에 대처하는 방어기작으로 이해할 수 있다. 특정 peroxidase isozyme의 발현과 활성증가를 환경스트레스에 대한 지표로 이용할 수 있기를 기대한다.

적 요

충남 태안군 안면도 해안가와 충남 아산시 신창면 내륙지역을 설정하여 두 지역에서 자라는 소나무(*Pinus densiflora*)의 peroxidase활성과 isozyme pattern을 비교분석하였다. 그 결과 안면도 해안지역 소나무 peroxidase의 비활성도가 신창 내륙 지역 소나무 peroxidase의 비활성도보다 평균 3 배 높았다. 두 지역 소나무 생태의 가장 큰 환경적 차이는 염의 농도이므로 안면도 지역 소나무 peroxidase의 활성증가현상은 안면도 지역의 환경스트레스에 대한 방어체계에 peroxidase가 관여할 가능성을 제시한다. 두 지역 peroxidase isozyme의 pattern을 starch gel electrophoresis를 통해 비교하였을 때, 두 지역 소나무에는 cathode로 이동하는 cationic isoperoxidase가 존재하지 않았고, 3개의 anionic isozyme A1, A2, A3가 공통적으로 존재하였다. 그러나 특이하게도 고염분 스트레스를 받게

되는 안면도 소나무잎에서만 isoperoxidase A1과 A2 사이에 isoperoxidase An이 과량 존재하였으므로 peroxidase isozyme An은 안면도해안지역의 고염분환경에 대한 방어기작으로 과량 유도되었을 것으로 추측할 수 있다. 두지역 소나무잎에서 각종 효소활성을 비교한 결과 신창지역 소나무 추출액에 비하여 안면도지역 소나무 추출액의 catalase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 비활성도가 약 1.8 배 높게 나타났다. 그러나 다른 효소들의 비활성도는 평균적으로 큰 차이가 없었다.

인 용 문 헌

- Aebi, H. (ed.). 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Inc, New York, pp.673.
- Alonson, R., V. Bermejo, S. Elvira and F.J. Castillo. 1993. Changes in extracellular peroxidase activity induced by natural levels of ozone in Eastern Spain. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 393-396.
- Azaizah, H. and E. Steudle. 1991. Effect of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays*) roots. *Plant Physiol*. 97: 1136-1145.
- Brett, C. and K. Waldron. 1990. *Physiology and biochemistry of plant cell wall*. London Unwin Hyman, Boston Stdney and Wellington.
- Ederva, A., G. Salcheva and D. Georgieva. 1993. Stress damage is related to peroxidase induction in wheat plant. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 401-404.
- Feierabend, J. and H. Beevers. 1972. Developmental studies on microbodies in wheat leaves. 1. Conditions influencing enzyme development. *Plant Physiology* 49: 28-32.
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 37: 165-186.
- Gaspar, T.H., C. Penel, D. Hagege and H. Greppin. 1991. *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of M. Curie-Sklodowska, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp.249-280.
- Grisebach H. 1981. Lignins. In E.E. Conn(ed.), *Biochemistry of plant*. New York, Academic Press, pp.457-478.
- Hiatt, A.J. 1961. Preparation and some properties of soluble succinate dehydrogenase from higher plants. *Plant Physiol*. 36: 552-557.
- Kammerer, S., W. Praznik, G. Jessner, R. Ebermann and S.A. Korori. 1993. Seasonal changes of peroxidase isozymes and activity of fructan containing plants. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 397-400.
- Kim, S.S., S.H. Wender and E.C. Smith. 1980. Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 19: 165-168.
- Lee, H.J. and S.E. Oh. 1994. Interrelationship between Environmental Stresses, Reactive Oxygen Species and Stress-Ethylene. *Korean J. Ecol* 17(1): 91-100.
- Lim, Y.H. and S.S. Kim. 1986. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from tobacco callus culture. *Korean Biochem. J.* 19(4): 424-432.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93: 265-275.
- McDougall, G.J. 1993. Covalently bound peroxidases and lignification. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 277-282.
- Padu, E., E. Hansen and A. Tanav. 1993. Changes in soluble and cell wall associated peroxidases during the lignification of wheat xylem cells. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 287-290.
- Pfanz, H., G. Schultz and B. Oppmann. 1993. Sulfur dioxide: Apoplastic peroxidases is more sensitive than photosynthesis. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 387-392.
- Sanchez, M., G. Revilla and I. Zarra. 1993. Role of cell wall peroxidases in the cessation of growth in pine hypocotyls. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp.

- 283-286.
- Schomburg, D. and D. Stephan(eds). 1991a, b, c, d. Enzyme handbook. Vol. 9. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Valpuesta, V., M.A. Quesada, F. Pliego, P.M. Hasegawa and M.A. Botella 1993. Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology III International Symposium. pp. 405-412.
- van Huystee, R.B. and W.L. Cairns. 1982. Progress and prospects in the use of peroxidases to study cell development. *Phytochemistry* 21: 1843-1847.
- Wongkaew, W., L. Meksongsee and P. Harinasut. 1991. Peroxidases of road trees that survive in polluted atmosphere. *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of M. Curie-Sklodowska, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp.459-462

(1997년 5월 23일 접수)